

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-500543

(43) 公表日 平成9年(1997)1月21日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 15/09  
1/15  
9/00  
9/30

Z N A

9162-4B  
7804-4B  
9359-4B  
8827-4BC 1 2 N 15/00  
1/15  
9/00  
9/30

Z N A A

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願平7-515688

(86) (22) 出願日 平成6年(1994)11月29日

(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)6月3日

(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 4 / 1 3 6 1 3

(87) 国際公開番号 W O 9 5 / 1 5 3 9 1

(87) 国際公開日 平成7年(1995)6月8日

(31) 優先権主張番号 0 8 / 1 6 1 , 6 7 5

(32) 優先日 1993年12月1日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク バイオテック, イン  
コーポレイティドアメリカ合衆国, カリフォルニア 95616  
-4880, ディビス, ドリュウ アベニュー  
1445(72) 発明者 パーカ, ランディ エム.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616,  
ディビス, モドック プレイス 3609(72) 発明者 ヨダー, ウェンディ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 95694,  
ウィンターズ, プレザント バレー 8503

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスペルギルス発現システム

(57) 【要約】

本発明は、A. ジャポニカス (A. japonicus) 型種を異種タンパク質の発現のための宿主細胞として使用する新規発現系に関する。

## 【特許請求の範囲】

1. プロモーターに作用可能に連結された異種タンパク質をコードする核酸配列を含んで成る、アスペルギルス・ジャポニカス (Aspergillus japonicus) 型宿主細胞。
2. 前記タンパク質が真菌タンパク質である、請求項1の宿主細胞。
3. 前記プロモーターが真菌プロモーターである、請求項2の宿主細胞。
4. 前記タンパク質が真菌酵素である、請求項2の宿主細胞。
5. 前記酵素が、カタラーゼ、ラッカーゼ、フェノールオキシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、ペルオキシダーゼ、リパーゼ、ヒドロラーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、プロテアーゼおよび他のタンパク質分解酵素、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、フィターゼ、リアーゼ、ペクチナーゼおよび他のペクチン分解酵素、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、マンノシダーゼ、イソメラーゼ、インベルターゼ、トランスフェラーゼ、リボヌクレアーゼ、キチナーゼ、並びにデオキシリボヌクレアーゼから成る群より選択される、請求項4の宿主細胞。
6. 選択マーカーを更に含んで成る、請求項1の宿主細胞。
7. 前記マーカーがargB, trpC, pyrG, amdSおよびhygBから成る群より選択される、請求項6の宿主細胞。
8. 前記プロモーターが、A. オリゼ (A. oryzae) のTAKAアミラーゼ、リゾムール・ミーハイ (Rhizomucor miehei) のアスパラギン酸プロテイナーゼ、A. ニガー (A. niger) のグルコアミラーゼ、A. ニガー (A. niger) の中性 $\alpha$ -アミラーゼ、A. ニガーの (A. niger) 酸安定性 $\alpha$ -アミラーゼおよびリゾムール・ミーハイ (Rhizomucor miehei) のリパーゼからのプロモーターから成る群より選択される、請求項2の宿主細胞。
9. A. ジャポニカス (A. japonicus)、A. アクレータス (A. aculeatus) またはA. ジャポニカス変種アクレータス (A. japonicus var. aculeatus) 種

のメンバーである、請求項1の宿主細胞。

10. 真菌プロモーターに作用可能に連結された異種真菌酵素をコードする核酸配列および選択マーカーを含んで成る、アスペルギルス・ジャポニカス (*Aspergillus japonicus*) 型宿主細胞。

11. リパーゼ、キシラナーゼおよびセルラーゼから成る群より選択された真菌酵素を含んで成る、請求項10の宿主細胞。

12. 前記プロモーターが、*A. オリゼ* (*A. oryzae*) のTAKAアミラーゼ、リゾムール・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) のアスパラギン酸プロテイナーゼ、*A. ニガー* (*A. niger*) のグルコアミラーゼ、*A. ニガー* (*A. niger*) の中性 $\alpha$ -アミラーゼ、*A. ニガー*の (*A. niger*) 酸安定性 $\alpha$ -アミラーゼおよびリゾムール・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) のリパーゼからのプロモーターから成る群より選択される、請求項10の宿主細胞。

13. 前記選択マーカーが、argB, trpC, pyrG, amdSおよびhygBから成る群より選択される、請求項12の宿主細胞。

14. 前記宿主細胞が*A. ジャポニカス* (*A. japonicus*)、*A. アクレータス* (*A. aculeatus*) または*A. ジャポニカス*変種アクレータス (*A. japonicus* var. *aculeatus*) 種のメンバーである、請求項10の宿主細胞。

15. TAKA-アミラーゼプロモーターに作用可能に連結された真菌

キシラナーゼをコードする核酸配列を含んで成り、そしてamdSまたはhygBマーカーを更に含んで成る、*A. ジャポニカス*宿主細胞である、請求項10の宿主細胞。

16. TAKA-アミラーゼプロモーターまたはAMGプロモーターに作用可能に連結された真菌リパーゼをコードする核酸配列を含んで成り、そしてamdSマーカーを更に含んで成る、*A. ジャポニカス*変種アクレータス宿主細胞である、請求項10の宿主細胞。

17. TAKA-アミラーゼプロモーターに作用可能に連結された真菌リパーゼをコードする核酸配列を含んで成り、そしてamdSマーカーを更に含んで成る、*A. アクレータス*宿主細胞である、請求項10の宿主細胞。

18. 着目のタンパク質の生産方法であって、プロモーターに作用可能に連結さ

れた異種タンパク質をコードする核酸配列を含んで成るアスペルギルス・ジャボニカス型宿主細胞を、該タンパク質の発現を可能にする条件下で培養し、そして培養物から該タンパク質を回収することを含んで成る方法。

19. 前記タンパク質が真菌タンパク質である、請求項18の方法。

20. 前記プロモーターが真菌プロモーターである、請求項18の方法。

21. 前記タンパク質が真菌酵素である、請求項20の方法。

22. 前記酵素が、カタラーゼ、ラッカーゼ、フェノールオキシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、ペルオキシダーゼ、リパーゼ、ヒドロラーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、プロテアーゼおよび他のタンパク質分解酵素、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、フィターゼ、リアーゼ、ペクチナーゼおよび他のペクチン分解酵素、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$

-グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、マンノシダーゼ、イソメラーゼ、インベルターゼ、トランスフェラーゼ、リボヌクレアーゼ、キチナーゼ、並びにデオキシリボヌクレアーゼから成る群より選択される、請求項21の方法。

23. 選択マーカーを更に含んで成る、請求項18の方法。

24. 前記マーカーがargB, trpC, pyrG, amdSおよびhygBから成る群より選択される、請求項23の方法。

25. 前記プロモーターが、A. オリゼのTAKAアミラーゼ、リゾム-コル・ミーハイのアスパラギン酸プロテイナーゼ、A. ニガーのグルコアミラーゼ、A. ニガーの中性 $\alpha$ -アミラーゼ、A. ニガーの酸安定性 $\alpha$ -アミラーゼおよびリゾム-コル・ミーハイのリパーゼからのプロモーターから成る群より選択される、請求項18の方法。

26. 前記宿主細胞がA. ジャボニカス、A. アクレータスまたはA. ジャボニカス変種アクレータス種のメンバーである、請求項18の方法。

27. プロモーターに作用可能に連結された異種タンパク質をコードする組換え核酸配列を含んで成る、アスペルギルス・ジャボニカス型宿主細胞。

28. 着目のタンパク質の生産方法であって、プロモーターに作用可能に連結さ

れた異種タンパク質をコードする組換え核酸配列を含んで成るアスペルギルス・  
ジャボニカス型宿主細胞を、該タンパク質の発現を可能にする条件下で培養し、  
そして培養物から該タンパク質を回収することを含んで成る方法。

## 【発明の詳細な説明】

アスペルギルス発現システム発明の分野

本発明は、組換えタンパク質の生産に有用な宿主細胞に関する。特に、本発明は、組換えタンパク質、特に酵素の高レベル発現に利用できるアスペルギルス属の真菌宿主細胞に関する。

発明の背景

異種タンパク質の発現に組換え宿主細胞を使うことは、近年、他の方法ではそれらの天然源からの精製によってのみ得られる商業的に有益なタンパク質の大量生産を大きく単純化した。現在、特定の任意のタンパク質の生産のためには原核および真核宿主を含む様々な発現系の選択肢がある。適当な発現系の選択は、しばしば活性状態で妥当な収率でタンパク質を生産できる宿主細胞の能力に依存するだけでなく、タンパク質の意図する最終用途によっても大きく左右されるだろう。

哺乳動物細胞と酵母細胞が最も汎用されている真核宿主であるが、糸状菌が組換えタンパク質生産用の宿主細胞として非常に有用であると現在認識され始めている。現在使われているかまたはそのような用途に提案されている糸状菌の中には、ニューロスボラ・クラッサ (Neurospora crassa)、アクレモニウム・クリソゲナム (Acremonium chrysogenum)、トリボクラジウム・ゲオデス (Tolypocladium geodes)、ムーコル・サーシネロイデス (Mucor circinelloides) およびトリコデルマ・レーセイ (Trichoderma reesei) がある。加えて、アスペルギルス属の幾つかの種は組換え

タンパク質生産のための宿主細胞として有効に使われている。アスペルギルスは、分生子柄から成る灌水器状物が頂囊で終わり、この頂囊が小柄またはフィアリド（小梗）と色々な名前と呼ばれる一層もしくは二層の同時形成された特殊細胞を生み、そして分生子と呼ばれる無性胞子を形成することにより特徴づけられる。アスペルギルス・ニデュランス (Aspergillus nidulans) 種は組換えプラスミドにより形質転換されると報告されている (Ballance他、Biochem. Biophys. Re

s. Comm. 112: 284-289, 1983) が、形質転換はかなり低い頻度で起こることがわかった。アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) とアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 両種も組換えタンパク質生産において有用であると記載されている。しかしながら、他のアスペルギルス種は異種タンパク質の発現に有用であると示されておらず、実際に、貧弱な発現および／またはプロテアーゼもしくはマイコトキシンの過剰生産のために、アスペルギルスの全ての種がこの目的に宿主細胞として適するわけではないし、或る種から判断して次の種へとこの能力を予測することもできない。理想的な発現系は、プロテアーゼおよびマイコトキシン並びに多量の内因性的に作られる分泌タンパク質の生産が実質的になく、且つ既知の宿主細胞よりも高いレベルの発現が可能であるものである。本発明は、それらの要件を満たす新規アスペルギルス発現系を提供する。

#### 発明の要約

本発明は、異種タンパク質をコードする核酸配列を含有する、アスペルギルス・ジャポニカス (Aspergillus japonicus) 型種、例えばアスペルギルス・ジャポニカス (Aspergillus Japonicus)、アスペルギルス・アクレータス (Aspergillus aculeatus) または

アスペルギルス・ジャポニカス変種アクレータス (Aspergillus japonicus var. aculeatus) 種の宿主細胞を提供する。「異種タンパク質」とは、宿主細胞にとって生来でないタンパク質、または生来の配列を変更する修正が行われている生来のタンパク質を意味する。好ましい態様では、該タンパク質は異種酵素である。該核酸配列は、選択された宿主細胞中で該核酸配列の転写を指令することのできる適当なプロモーター配列に作用可能に連結される。

本発明はまた、組換えタンパク質の生産方法であって、異種タンパク質をコードする核酸配列を含有する上述した種のうちの1つの宿主細胞を、該タンパク質の発現を促す条件下で培養し、そして培養物から該タンパク質を回収することを含んで成る方法にも関する。好ましい態様では、該タンパク質は真菌タンパク質であり、最も好ましくは真菌酵素である。

本発明の宿主細胞および方法は、意外にも、他の既知のアスペルギルス種、例

えばA. オリゼよりも、幾つかの真菌酵素の組換え生産においてより優れている。

#### 発明の詳細な説明

アスペルギルス・ジャポニカス (Aspergillus japonicus)、アスペルギルス・ジャポニカス変種アクレータス (Aspergillus japonicus var. aculeatus) またはアスペルギルス・アクレータス (Aspergillus aculeatus) 種は全て、アスペルギルス属の黒色 (Nigri) 部門に属する。アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) により代表されるような黒色部門のメンバーは、放射状分生子頭と黒色気味の分生子集団；球状頂囊；滑らかで透明な、または頂囊の下が着色している菌柄；存在するかまたは欠けており、しばしば着色しているメツラ (基底梗子) により特徴づけられる

(“The Genus *Aspergillus*”, K.B. RaperおよびD.I. Fennel 著, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1965)。胞子色と装飾物、または他の微視形態的特徴が異なるそれらの株の変異体もこの部門に含められる。アスペルギルス属の黒色部門では、主な分類法が第一に基礎にしている (即ち、Raper およびFennel, 前掲) コロニーの色と分生子形成構造が多様であるため、分類群の境界は論争中である。Raper およびFennelにより認められたA. ジャポニカス関連分類群はA. ジャポニカスとA. アクレータスである。SamsonおよびGams (“Advances In *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics”, SamsonおよびPitt編, 1985) はA. ジャポニカスのみを認め、そしてAl-Mussallam (“Revision of the Black *Aspergillus* Species”, Ph.D. Thesis, University of Utrecht, 1980) はA. ジャポニカス変種ジャポニカスとA. ジャポニカス変種アクレータスを認めている。

A. ジャポニカス種は一般に、一列の小柄および球状～半球状の顕著な棘状の分生子により特徴づけられる。頂囊は普通20～35 $\mu$ であるが15～45 $\mu$ にも及ぶ。この種はSaito, Botan. Mag. 20:61-63, 1906により最初に記載された。より詳しくは、この種は次のように特徴づけられる。Czapek溶液寒天上のコロニーは室温 (24～26℃) で迅速に増殖し、ほとんどの株は10日間で5.0～6.0 cm、株によ



ってはより小さいことがあり、密集した、白色の、不規則にしわの寄った基底菌糸から成り、該菌糸はゆっくりと茶紫または黒紫色を帯びた分生子構造の密集鎖になり、株によってはコロニーの中央領域に豊富な白～クリーム色の球状菌核を生成し；裏側は最初は無色で後に紫茶色になり、時には僅かに黄緑色を帯び；滲出物が無く；臭いは時折非常に強いが特有ではない。分生子頭は多様で、小さく、放射状であるかまたは幾つかの不明瞭な柱状部に割れ、まれに10日

で直径300  $\mu$ を越えるが、老齢期には時々明瞭な円柱状で且つ長さが600～700  $\mu$ までであり、または同様な長さの2つの分岐した柱状部に割れ；分生子柄は滑らかかまたは限られた表面粒点を有し、無色であるかまたは特に頂囊のすぐ下がわずかに着色しており、波状で、大部分が500～1000  $\mu \times 5 \sim 10 \mu$ であるが、それらの寸法は大きく異なり；頂囊はいくらか黄褐色気味に着色しており、しばしば幾分伸びた形であるが、加齢または成長と共に頭部はほとんど球状になり、大部分は20～30  $\mu \times 25 \sim 35 \mu$ で、直径は15  $\mu$ 未満から45  $\mu$ まで異なり、正常な頭部ではそれらの表面の大部分が稔性であるが小さな頭部では頂点のみが稔性であり；梗子是一列で、5.5～8.0  $\mu \times 3.0 \sim 4.5 \mu$ 、まれにそれらの正常サイズの二倍に膨張し；分生子は大部分が球状、時に半球状で、多棘状であり、棘は分離し規則的な間隔を有し、通常長さ0.5  $\mu$ で時にはそれより長く、胞子体は大部分が3.0～3.5  $\mu$ であり；菌核は豊富に、ある株ではゆっくりと、白～クリーム色で球状の直径500  $\mu$ まで生成する。肉エキス寒天上のコロニーは、迅速に室温で10日日で直径7～8 cmに成長し、Czapek上よりも迅速に且つ多量に胞子形成し；分生子頭はCzapek上よりも通常大きく且つ顕著な円柱状塊に割れ、通常10日間で500  $\mu$ の直径に達し、頂囊および軸測定値がより狭い範囲を示し；梗子および分生子は上述した通りである。A. ジャボニカス変種アクレータス亜種は次の特徴により区別される。Czapek寒天上のコロニーは14日間で直径5.5 cmになり、かなり密集した、不規則的にしわの寄った、白色の基底フェルト状物から成り；ある株は羊毛状気菌糸を生成し；裏側は最初は無色で加齢と共に茶色になり；分生子頭は塊状で、Quaker Drab およびDusky Drabに近い紫がかった茶色で、球状～放射状で、明瞭に分離した柱状部に割れており、直径200～300  $\mu$ であり；柄のある

分生子柄は滑らかで、透明かまたは

軸のところがわずかに着色しており、直立で、長さ350 ~ 4500  $\mu$ 、通常は1000 ~ 2000  $\mu$ 、幅9.0 ~ 13.5  $\mu$ であり；頂囊は褐色で、直径30 ~ 90  $\mu$ 、通常45 ~ 67  $\mu$ であり、大きな頂囊では全面に密集したフィアリドを有しそして小さな頂囊では上側の3/4にフィアリドを有し；フィアリドは7.5 ~ 10  $\mu$   $\times$  4 ~ 5  $\mu$ であり；分生子は透明 ~ 褐色で、多棘状で、半球状であるが大部分は楕円体で、4 ~ 5  $\mu$   $\times$  3.5 ~ 4.5  $\mu$ であり；ある株では密集帯に、球状 ~ 半球状、直径450 ~ 675  $\mu$ 、しかし800  $\mu$ までの菌核が豊富に生じる。

密接に関連した種であるA. アクレータスは、一列の梗子、および半球状から明瞭な楕円形が多棘状の分生子により一般的に特徴づけられる。頂囊は通常60 ~ 80  $\mu$ で、35 ~ 100  $\mu$ に及ぶ。より詳しくは、この種は次のように定義される。Czapek溶液寒天上のコロニーは室温（24 ~ 26℃）で迅速に増殖し、12日間で直径5 ~ 6 cmであり、平坦であり、分生子構造の密集鎖を生じ、紫茶または紫黒色味を帯びて全体に渡り激しく胞子形成し、しばしば淡い灰色 - 黄褐色表面の「花」を有し；裏側は無色であるかまたはかなり棘状でコロニー中心が黄色から黒に近い色を帯び、黄色色素が広がっており；滲出物または臭いは無く；株によっては白色 ~ クリーム色の梗子がコロニー中心および隣接した縁のところに最も豊富に生じる。分生子頭は、最初は球状で、次いで比較的数の少ない分離した密集型柱状部に割れ、直径は1 mmまでに達するが通常は500 ~ 700  $\mu$ であり、脱落性の柱状部によって容易に粉々になり、個々の頭部はしばしば色が多様であり、頂囊に最も近い分生子は淡い黄褐色を帯びており；分生子柄は無色であるかまたは頂囊の下がわずかに褐色であり、通常は1 ~ 2 mm  $\times$  9 ~ 13  $\mu$ であるが、長さは2.5 mmまでそして直径は18 ~ 29  $\mu$ までに及び、厚さ2.0 ~ 2.5  $\mu$ までの壁を有し、平滑であるかまたは時折粒状物質の限定付着を示すことがあり；頂囊は、若

い時は幾分伸びた形であるが、十分に発達した時には球状またはほとんど球状であり、厚い壁を有し、普通は褐色気味に着色しそして直径60 ~ 80  $\mu$ であるが、35 ~ 100  $\mu$ に及ぶことができ、全面に渡り稔性であり；梗子は一列で、密に詰まっ

ており、 $6.5 \sim 10.0 \mu \times 3.0 \sim 4.4 \mu$ であり；分生子は明瞭な楕円形から球状またはほとんど球状で、株間でまたは株内で異なり、大部分は $3.5 \sim 4.0 \mu \times 4.5 \sim 5.0 \mu$ であるが、時には細胞が $4 \times 7 \mu$ ほどの大きい寸法を示すことがあり、数が増えると紫がかった色合いを示し、分離し且つより広く間隔のあいた棘を有する多棘状である。この種はIizuka, J. Agr. Chem. Soc. Japan 27: 806, 1953中に最初に記載された。

本明細書および請求の範囲を通して、用語「A. ジャポニカス型種」の使用が、上述した3つの種に含まれる生物だけでなく、既に記載されているかまたは別の分類法において現在他の種と指定されているが、上記に定義したものと同一形態的および培養的特徴を有し、A. ジャポニカス、A. ジャポニカス変種アクレータスまたはA. アクレータスの別名であるかもしれないそれらの種も包含することは理解されよう。例えば、A. ジャポニカス/A. ジャポニカス変種アクレータスの別名としては、次のものが挙げられる（しかしそれらに限定されない）：  
 A. ジャポニカス・サイトウ・変種カピラタス、ナカザワ、タケダおよびスエマツ（A. japonicus Saito var. capillatus Nakazawa, Takeda and Suematsu）、  
 A. マルバセウス・モサリー（A. malvaceus Mosseray）、A. アトロビオラセウス・モサリー（A. atro-violaceus Mosseray）、A. アトロフスカス・モサリー（A. atrofuscus Mosseray）、A. ビオラセオフスカス・ガスペリーニ（A. violaceo-fuscus Gasperini）、A. ブルネオビオラセウス・バトおよびマイア（A. brunneo-violaceus Bat. and Maia）（Al-Mussallam, 前掲）；およびA. ジャポニカス変種

アトロフスカス・イイズカ（A. japonicus var. atrofuscus Iizuka）（J. Agr. Chem. Soc. Japan 27: 807, 1953）。A. アクレータス/A. ジャポニカス変種アクレータスの別名としては、A. エゾエンシス・ササキ（A. yezoensis Sasaki）（Al-Mussallam, 前掲）、A. ジャポニカ変種ビリジフラブス・イイズカ（A. japonicus var. viridiflavus Iizuka）（J. Agr. Chem. Soc. Japan 27: 807, 1953）およびA. ビオラセオフスカス・ガスペリーニ（A. violaceo-fuscus Gasperini）（Att. Soc. Toscana Sci. Nat. Pisa, 8(2): 326-328, 1887）が挙

げられる（がそれらに限定されない）。

宿主細胞候補の最初の決定は、アスペルギルス属の異なる分類部門に属する15以上の種からの様々な単離物により生産されるプロテアーゼのレベルの評価によって行う。これは、各単離物を酸性、中性およびアルカリ性 pH でのカゼイン透明化平板アッセイにおいて試験することにより達成される。驚くべきことに、黒色 (Nigri) 部門の幾つかのメンバーが、生産される任意の組換えタンパク質の分解を潜在的に引き起こし得るプロテアーゼを最少量生産したという点で、最も良く働くことがわかった。この基準に基づいて、更なる研究のために次の6種を選択する：A. ジャポニカス (A. japo-nicus)、A. ジャポニカス変種アクレータス (A. japonicus var. aculeatus)、A. アクレータス (A. aculeatus)、A. タマリイ (A. tamarii)、A. カルボナリウス (A. carbonarius) および A. フェニシス (A. phoenicis)。

次いで、選択された種を形質転換することを試みる。最初の努力は標準的な A. オリゼ (A. orizae) 形質転換技術の使用に集中する (Christensen他, Bio/Technology 6: 1419-1422, 1988; EP出願第87 103 806.3号)。簡単に言えば、プロトプラスト形成、形質転換、およびamdSまたはヒグロマイシン B (hygB) マーカー遺伝子

についての選択に向けて、A. オリゼのプロトコールを使って同時形質転換体を得る。発現ベクターは、異種コード配列に加えて、A. オリゼのTAKA-アミラーゼ遺伝子と、A. ニガーのグルコアミラーゼ遺伝子からの転写終結シグナルを含有する。形質転換頻度は、DNA 1  $\mu$ gあたり1未満から約10まで異なる。下記の実施例に詳述されるような発現ベクターを使った同時形質転換実験では、同時形質転換の頻度は0~60%の範囲である。

次いで形質転換された種を観察して様々な異種酵素の発現レベルを測定する。試験した異種酵素としては、フミコーラ・ラヌギノーザ (Humicola lanuginosa) リパーゼ (HLL)、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens) キシラナーゼ (キシラナーゼ)、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens) セルラーゼ (セルラーゼ)、コプリナス・シネレウス (Coprinus cinereus) ペ

ルオキシダーゼ (C i P) およびカンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*) リパーゼ A が挙げられる。驚くべきことに、A. ジャボニカス様群の 3 つの種は上記酵素の 1 または複数について良好な発現を示し、ある場合には、対照の A. オリゼ株よりも良い酵素収率を示した。特に A. アクレータス、A. ジャボニカスおよび A. ジャボニカス変種アクレータスの各々の多数の株が振盪フラスコ培養において非常に高いレベルの H L L (約 1 g / l) を生産する。加えて、A. ジャボニカスは、A. オリゼ株および A. ニガー株中でのこの酵素の生産と比較して優れたキシラナーゼ生産を示す。更に、振盪フラスコ中の A. アクレータスは約 1.0 g / l の範囲でカンジダ・アンタークティカのリパーゼ A を生産し、このレベルは、同じ条件下で培養した対応する A. オリゼ形質転換体よりも約 3 ~ 4 倍高い。それらの試験結果の要約は表 2 に与えられる。

結果が明らかに示すように、各種の数個の単離物が異種タンパク

質を生産することができる。よって、この能力は単一の単離物または株に限定されるのではなく、むしろ全体としてこの種の集団の特徴であると理解される。当業者は、それらの種の他の株または単離物も異種酵素の発現に利用できると認識するだろう。各種の多数の株が ATCC (the American Type Culture Collection; 12301 Park-lawn Drive, Rockville Maryland 20852) ; NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection; 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604) ; FGSC (Fungal Genetics Stock Center; Kansas) ; DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; Mascheroder Weg 1 B, D-3300 Braunschweig, Germany) ; IAM (Institute of Applied Microbiology; 113 東京都文京区弥生町 1 丁目 1 - 1、東京大学) ; IFO (Institute for Fermentation; 532 大阪府淀川区十三本町 2 丁目 17-85) および CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures; Oosterstraat 1, 3740 AG Baarn, Netherlands) の寄託機関において公に入手可能である。

当業者は、本明細書中に記載の宿主種の好結果の形質転換が、特に例示されたベクター、プロモーターおよび選択マーカーの使用に限定されないことも認識するだろう。一般的に言って、A. オリゼ、A. ニガーおよび A. ニデュランスの

形質転換において有用であるそれらの技術は、本発明の宿主細胞にも有用である。例えば、amdSおよびhygB選択マーカーが好ましいけれども、他の有用な選択マーカーとしてargB (A. ニデュランスまたはA. ニガー)、trpC (A. ニガーまたはA. ニデュランス)、またはpyrG (A. ニガーまたはA. ニデュランス) マーカーが挙げられる。プロモーターは、それらの種において強力な転写活性を示す任意のDNA配列であることができ、そして細胞外と細胞内の両方のタンパク質、例えばアミラ

ーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼおよび解糖酵素をコードする遺伝子から誘導することができる。そのような適当なプロモーターは、A. オリゼのTAKAアミラーゼ、リゾムール・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) のアスパラギン酸プロテイナーゼ、A. ニガーのグルコアミラーゼ、A. ニガーの中性 $\alpha$ -アミラーゼ、A. ニガーの酸安定性 $\alpha$ -アミラーゼ、およびリゾムール・ミーハイのリパーゼをコードする遺伝子から誘導することができる。解糖酵素の遺伝子からのプロモーターの例は、TPI, ADHおよびPGKである。プロモーターは同種プロモーター、即ち生来のA. ジャボニカス型遺伝子のプロモーターであってもよい。本発明の好ましいプロモーターは、A. オリゼのTAKAアミラーゼプロモーターである。TAKAアミラーゼは公知の $\alpha$ -アミラーゼである (Toda他, Proc. Japan Acad. 58 Ser.B.: 208-212, 1982)。プロモーター配列と着目の遺伝子または選択されたシグナルペプチドまたはブレ領域との連結を容易にする特定の制限部位を導入する目的で、プロモーター配列にリンカーを提供してもよい。ターミネーターとポリアデニル化配列もプロモーターと同じ源から誘導することができる。構成物中にエンハンサー配列を挿入することもできる。

発現産物を獲得するのに細胞を破壊する必要性を回避するために、および細胞内で起こりうる発現産物の分解の量を最小にするために、該産物が細胞の外に分泌されることが好ましい。このために、好ましい態様では、着目の遺伝子は、発現産物を細胞の分泌経路に差し向けることができるブレ領域、例えばシグナルペプチドまたはリーダーペプチドに連結される。ブレ領域は任意の生物からの任意

の分泌タンパク質の遺伝子から誘導してもよく、または生来のブレ領域であってもよい。そのようなブレ領域のための有用な入手源の中には、アスペルギルス種からのグルコアミラーゼもしくはアミラーゼ

遺伝子、バシラス (*Bacillus*) 種からのアミラーゼ遺伝子、リゾムール・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) からのリパーゼもしくはプロテイナーゼ遺伝子、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) からの  $\alpha$ -因子遺伝子、または子牛のプロキモシン遺伝子がある。最も好ましくは、ブレ領域はA. オリゼのTAKAアミラーゼ遺伝子、A. ニガーの中性  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、A. ニガーの酸安定性  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、B. リヘニフォルミス (*B. licheniformis*) の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、バシラスNCIB 11837からのマルトース産生アミラーゼ遺伝子、B. ステアロサーモフィラス (*B. stearothermophilus*) の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子、またはB. リヘニフォルミス (*B. licheniformis*) のズブチリン遺伝子である。有効なシグナル配列はA. オリゼのTAKAアミラーゼシグナル、リゾムール・ミーハイのアスパラギン酸プロテアーゼシグナル、およびリゾムール・ミーハイのリパーゼシグナルである。代替のものとして、発現させようとする遺伝子にとって生来であるブレ領域を使ってもよい。

プロモーターおよびターミネーター配列に作用可能に連結された所望の生成物の遺伝子は、選択マーカーを含むベクター中に含めることができ、または宿主株のゲノム中に組み込むことができる別個のベクターもしくはプラスミド上に置くことができる。ベクター系は単一のベクターもしくはプラスミドであることができ、またはゲノム中に組み込もうとする全DNAを一緒になって含有する2以上のベクターもしくはプラスミドであることができる。ベクターまたはプラスミドは直鎖状分子であっても閉環状分子であってもよい。本発明の好ましい態様によれば、1つが選択マーカーを含み、そしてもう1つがプロモーター、所望のタンパク質をコードする遺伝子並びに転写ターミネーターおよびポリアダニル化配列を含む導入し

ようとする残りの異種DNAを含んで成る、2つのベクターを使って宿主を形質

転換させる。

本発明の宿主細胞種は、任意の原核または真核生物の着目の異種タンパク質を発現させるのに用いることができ、好ましくは、真核生物のタンパク質を発現させるのに使われる。共に食品産業における使用が認可されているという点で、A. ジャボニカス種とA. アクレータス種が特に有用である (Regulatory Aspects of Microbial Food Enzymes, Third Edition, The Association of Microbial Food Enzyme Producers, Brussels, Belgium)。それらの種について特に着目されるのは、異種タンパク質、特に真菌酵素の発現におけるそれらの利用である。カタラーゼ、ラッカーゼ、フェノールオキシダーゼ、オキシダーゼ、オキシドレダクターゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、ペルオキシダーゼ、リパーゼ、ヒドロラーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、プロテアーゼおよび他のタンパク質分解酵素、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、フィターゼ、リアーゼ、ペクチナーゼおよび他のペクチン分解酵素、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、マンノシダーゼ、イソメラーゼ、インベルターゼ、トランスフェラーゼ、リボヌクレアーゼ、キチナーゼ、並びにデオキシリボヌクレエアーゼのような酵素を発現させるのに本発明の新規発現系を使うことができる。用語「真菌酵素」は生来の真菌酵素だけでなく、アミノ酸の置換、削除、付加、または活性、熱安定性、pH耐容性等を増強するために行うことができる他の修正により変更されているそれらの真菌酵素も包含することは、当業者により理解されるだろう。

本発明の宿主細胞は、宿主細胞にとって生来であるタンパク質の組換え生産にも用いることができる。そのような用法の非限定的例

としては、タンパク質の発現を増強するため、シグナル配列の使用によって着目の生来のタンパク質の細胞外への輸送を促進するため、または主題の宿主細胞により通常生産されるタンパク質のコピー数を増加させるために、異なるプロモーターの調節下にA. ジャボニカス型の生来のタンパク質を置くことが挙げられる。よって、本発明は、そのような発現が宿主細胞にとって生来でない遺伝要素の使用、または宿主細胞中に通常は見られない様式で働くように操作されている生



来の要素の使用を含む限り、そのような同種タンパク質の組換え生産も包含する。

本発明を次の非限定例により更に説明する。

#### I. プロテアーゼアッセイ

少なくとも15の異なる種からの50以上の株を試験し、各単離物により生産されるプロテアーゼの量を測定し、そしてそれらの細胞外タンパク質分布も観察する。培養接種試料を調製するために、9 cmのペトリ皿中の各株の7~10日培養物に10 mlの滅菌蒸留水を加え、菌糸から静かに胞子をかき取り、濃厚な懸濁液を作る。この懸濁液2.57 mlを使って100 mlのASP04 培地に接種する〔ASP04 培地は、水道水中に1 g/l の $\text{CaCl}_2$ 、2 g/l の酵母エキス、1 g/l の $\text{MgSO}_4$ 、5 g/l の $\text{KH}_2\text{P O}_4$ 、2 g/l のクエン酸、0.57 mlの微量金属溶液（14.3 g/l の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g/l の $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、13.8 g/l の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8.5 g/l の $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ および3 g/l のクエン酸から成る）、1 g/l の尿素、2 g/l の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、20 g/lのマルトデキストリン（8 mlの25%原液、加圧滅菌後に加える）を含んで成り、加圧滅菌前にpHを4.5 または6.5 に調整し、次いで加圧滅菌後に100 mlあたり8 mlの0.1 Mクエン酸を使ってpH 4.5に調整した〕。フラスコを、200 rpmで軌道振盪器上で振盪させながら、連

続した光の中で30および/または37℃で5日間インキュベートする。各々の培養ブロスからの上清を2500 rpmで5分間遠心し、そしてカゼイン透明化平板アッセイで使用し、様々な真菌種から生産されるプロテアーゼのレベルを測定して組換えタンパク質発現の有力な候補として評価する。

カゼイン透明化平板アッセイは次のようにして行われる。平板培地は、20 g/lの脱脂粉乳、20 g/lのアガロース、およびpH 5とpH 7で行われる試験には0.2 Mのクエン酸塩-リン酸塩緩衝液、pH 9で行われる試験にはグリシン-NaOH緩衝液から成る。脱脂粉乳を100 mlの緩衝液と混合し、60℃に維持する。アガロースを400 mlの緩衝液と混合し、そして5分間加圧滅菌する。わずかに冷却した後、温かい脱脂粉乳混合物を添加し、混合物を穏やかに2~3回反転させて混合する。平板あたり50~70 mlを使ってこの培地を150 mmの平板に注ぎ、使用まで5℃で貯

蔵する。

使用直前に、寒天の中に平板あたり12個の穴を作る。各株の醗酵物からの上清 25  $\mu$  l を各pHの平板1枚に加え、37℃で一晩インキュベートする。pH 9の平板には、0.5 M 氷酢酸を加えてカゼインを沈澱させ、どんな透明帯でも可視化する。次いで各平板を透明帯のサイズ（即ち、透明帯なしから直径 > 2cmまで）と透明帯の型（即ち、透明、不透明または両方の型）について評価する。

各培養物の上清を使って、株の細胞外タンパク質生産も評価する。製造業者の取扱説明書に従って調製したNovex (San Diego, CA) 8 ~ 16% 勾配ゲルを使ってタンパク質分布を評価する。培養上清の75  $\mu$  l（3日および5日）試料を、20  $\mu$  l の5×解離緩衝液（解離緩衝液=4 mlの1 M Tris-HCl, pH 6.8, 1 gのSDS, 6 17mgのジチオスレイトールを滅菌蒸留水で10mlにする）とグリセロール/プロモフェノールブルー（約10mlの80~90%グリセロールに10~20mgを加え、

沸騰した湯の中に1~2時間置いて溶解させたもの）に添加し、5分間煮沸し、冷却し、負荷し、そしてプロモフェノールブルー追跡色素がゲルの下端に達するまで60~200 Vで泳動する。Biorad Silver Stain Plusプロトコール（Biorad Laboratories, Hercules, CA）に従ってゲルを銀染色する。多数のバンドを示すそれらの単離物は有力な新規宿主としてあまり適当でないと見なし、一方でわずか1~4本の少量バンドを有する比較的きれいな分布を示すものは更なる試験にかける。

プロテアーゼアッセイとタンパク質分布の組合せ結果を吟味すると、適当な有力候補の大部分は黒色（Nigri）部門のメンバーの中に見つかる。それらの結果に基づいて、次の単離物を形質転換実験のために選択した：A. ジャボニカス A 1438 (CBS 568.65)、A. アクレータス N1136 (CBS 101.43)、A. アクレータス A1454 (CBS 172.66)、A. アクレータス A1455 (CBS 186.67)、A. ジャボニカス変種アクレータス N0956 (IAM 13871)、A. フェニシス A528 (CBS 139.48)、A. フェニシス A530 (CBS 137.52)、A. フェニシス E419 (CBS 137.52)、A. カルボナリウス A3993 (IBT 4977)、A. カルボナリウス ATCC 1025、A. タマリイ E112 (ATCC 10836)、A. タマリイ N2266 (IFO 4358) および A

タマリイ N2267 (IFO 4142)。それらの培養物は、ノボ・ノルディスク・バイオテック・カルチャー・コレクション (Novo Nordisk Biotech Culture Collection; Davis, California) の一部としても維持される。

## II. ベクターの作製

A. 選択マーカーベクター。ベクター pJaL77 と pJaL154 をヒグロマイシン B 耐性選択マーカーによる宿主細胞の形質転換に使用する。

このマーカーは E. コリのヒグロマイシン B ホストトランスフェラーゼ遺伝子に基づいており、pJaL77 中では TAKA プロモーターの調節下にそして pJaL154 中では amdS プロモーターの調節下に置かれる。簡単に言えば、それらのベクターは次のようにして作製される。ヒグロマイシン B に対する耐性を付与する遺伝子を、Boehringer Mannheim からプラスミド pHph-I として購入する。この遺伝子に、プライマー：5'-GCT CAG AAGCTT CCATCC TAC ACC TCA GCA ATG TCG CCT GAA CTC ACC GCG ACG TCT-3' (N-末端) と 3'-CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG CTCCAG AGATC T CAT GCT-5' (C-末端) を使って、PCR によりアミノ末端とカルボキシ末端に適切な制限部位並びに ATG コドンを取り付ける。PCR 断片を制限酵素 BamHI と XhoI で切断し、次いでアスペルギルス発現ベクター pToC68 (WP 91/17243 中に記載されている) 中の対応部位にクローニングして pJaL77 を作製する。

プラスミド pJaL154 は次のようにして作製する。次のプライマー (下線領域は amdS プロモーターとの相同性を示す) CCT GGA TCC TCT GTG TTA GCT TAT AG および CTT GCA TGC CGC CAG GAC CGA GCA AG を使った PCR により、プラスミド pCaHj406 から amdS プロモーター変異体 I, + I, (Hynes 他, Mol. Cell. Biol. 3(8): 1430-1439, 1983 および Katz 他, Mol. Gen. Genet. 220: 373-376, 1990) をクローニングする。amdS プロモーターを含む 694 bp の PCR 断片を BamHI と SphI で切断し、pJaL77 の TAKA プロモーターが amdS プロモーターで置換されるように pJaL77 中の対応部位にクローニングする。

amdS マーカーを含むプラスミド pToC90 は、p3SR2 (Hynes 他, 前掲) からの 2.7 kb XbaI 断片を、XbaI で切断しそして脱リン酸した pUC19 プラスミド中にクローニングすることにより作製する。pToC186 と命名された誘導体は、プロモータ

# 一領域がamdS遺伝子の発現

を増強することが知られている2つの変異体 (I, と I<sub>...</sub>) を含むこと以外はpT oC90と同じである (Hynes 他, 前掲; Corrick 他, Gene 53: 63-71, 1987)。

## B. 発現ベクター。

1. カンジダ・アンタークティカ (Candida antarctica) リパーゼ。カンジダ・アンタークティカのリパーゼAの発現のために、C. アンタークティカ株LF058 (DSM 3855)の染色体DNAをYelton他の方法 (PNAS USA 81: 1470-1474, 1984) に従って抽出する。精製したDNAをSau3Aで部分的に切断しそしてアガロースゲル電気泳動した後、3-9 kbの範囲の断片を単離する。サイジングされたSau3A断片を、BamHIで切断し脱リン酸したプラスミドpBR322 (New England Biolabs) 中に連結せしめる。連結混合物を用いてE. コリMT172を形質転換させる。約50,000のE. コリ形質転換体を得、その80%がLF058のDNA挿入断片を含有する。

標準的なコロニーハイブリダイゼーション技術により、成熟C. アンタークティカリパーゼから決定したN末端配列に基づいた縮重17マーである<sup>32</sup>P-リン酸化オリゴヌクレオチドプローブNOR 440を使って、それらのコロニーをスクリーニングする。34個のコロニーが低緊縮性での洗浄 (41℃および6×SSC) 後に陽性を示す。それらのコロニーからプラスミドを調製し、そしてBstNIでの制限後にサザンハイブリダイゼーションにより分析する。サザン用プローブは、コロニーハイブリダイゼーションで使ったNOR 440プローブかまたは<sup>32</sup>P-標識プローブNOR 438である。NOR 438プローブは、13番目の塩基が酵母と糸状菌のコドン用法に基づいて選択されている、リパーゼのアミノ酸配列に相当するオリゴヌクレオチドである。

AACCCATACGACGACCC

NOR 440

T C T T T  
G  
T

GCTGCTCTGCGCTAA~~CCCT~~TACGACGACCCTTTCTACACCACCC

NOR 438

T T T

推測位置が指示されている。

唯一のプラスミドpMT1076 が、低緊縮性でNOR 440および幾分高い緊縮性 (55℃および1×SSC) でNOR 438の両方にハイブリダイズするバンドを含む。

pMT1076 の制限地図を作成し、Maxam-Gilbert 法により配列を決定する。その配列を配列表の配列番号1に示す。転写解読枠は21アミノ酸の推定上のシグナルと、成熟リパーゼのN末端の前にある10アミノ酸のプロペプチドもコードする。該プロペプチドの最後の2つのアミノ酸は、*S. cerevisiae* (S. cerevisiae) KEX-2 型の酵素によるタンパク質内分解プロセシングのための典型的な開裂部位であるArg-Arg である。アミノ酸配列は配列表の配列番号2に与えられる。多数の標準的なプラスミド操作 (Maniatis他, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, NY, 1982) を経て、*C. antarctica* のリパーゼAの転写解読枠をA. オリゼの $\alpha$ -アミラーゼプロモーターとA. ニガーのグルコアミラーゼ転写ターミネーターの間に正しい方向で配置する。得られた発現プラスミドはpMT1229である。

2. フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*) キシラナーゼ。ベクターpHD414はプラスミドp775 (EP 238 023) の誘導体である。このプラスミドとは異なり、pHD414はTAKAプロモーターとAMG ターミネーターの間に一連のユニークな制限部位を有する。該プラスミドは、ターミネーターの3'末端の長さ約200 bpの断片 (望ましくないRE部位を含む) の除去に続き、プロモーターの5'

末端の長さ約250 bpの断片 (同じく望ましくない部位を含む) の除去により作製される。NarI (pUCベクター中に存在する) とXbaI (ターミネーターのすぐ3'側) での消化により200 bp領域を除去し、次いで生成した末端をクレノウDNAポリメラーゼ+dNTPを使ってフィルインし、ベクター断片をゲル上で精製し、そしてベクター断片を再連結する。このプラスミドをpHD413と命名する。pHD413をStuI (プロモーターの5'末端に位置する) とPvuII (pUCベクター中) で切断し、ゲル上で分画しそして再連結し、pHD414を得る。pYES中に約1,100 bpのキシラナーゼHindIII/XbaI cDNA断片を含有するE. コリの株をDSM 6995としてDSMに寄託する。該キシラナーゼcDNA断片をHindIII/XbaIでの開裂によりクローン

の1つから単離する。該断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、電気溶出させ、連結反応に向けて準備する。該cDNA断片をpHD414中に連結してpAXX40-1-1を作製する。キシラナーゼ遺伝子およびタンパク質の配列は配列表の配列番号3と4に与えられる。該遺伝子をDSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen GmbH)6995として寄託する。

3. フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens) セルラーゼ。フミコーラ・インソレンスのセルラーゼの詳細な特徴づけはW091/17243中に見つかる。セルラーゼ発現に使った発現ベクターpCaHJ418は、制限酵素BamHI とSalIでの開裂によりpCaHj201から926 bpセルラーゼコード領域断片を切除することにより作製される。この断片を標準技術を使った調製用ゲル電気泳動により精製し、そしてBamHI とXhoIで処理しておいたpHD414(上述)と連結せしめる。得られた発現ベクターpCaHj418は、A. オリゼのTAKAアミラーゼプロモーターとA. ニガーのグルコアミラーゼターミネーター領域の転写調節下にセルラーゼ遺伝子を含有する。

4. フミコーラ・ラヌギノーザ (Humicola lanuginosa) リパーゼ。H. ラヌギノーザのリパーゼ遺伝子の単離および発現はEP 305216 中とUS出願第07/236,605号中に報告されており、その内容は参考として本明細書中に組み込まれる。簡単に言えば、ホモジナイズしたH. ラヌギノーザ菌糸からBoel他(EMBO J. 3: 1097-1102, 1984)とChirgwin他(Biochemistry 18: 5294-5299, 1979)により記載された方法を使って全RNAを抽出する。AvivおよびLeder(PNAS USA 69: 1408-1412, 1972)により記載されたようなオリゴ(dT)-セルロース上での2度のアフィニティークロマトグラフィーにより、ポリ(A)含有RNAを得る。次いでOkayama およびBerg(Mol. Cell. Biol. 2:161-170, 1982)により記載された方法と、Noma他(Nature 319:640-646, 1986)により記載されたベクターpSP62-K2とpCDVI-PLを使ってcDNAを合成する。合成したcDNAをE. コリMC1000のhsdR<sup>-</sup>, M<sup>+</sup>誘導体(Casadaban およびCohen, J. Mol. Biol. 138: 179-207, 1980)中に形質転換せしめ、組換えクローンを作製する。

32個のペンタデカマー(15マー)オリゴデオキシリボヌクレオチドの混合物

```

      A  A  A  A  A
d( TT AA TG TT AA)
      G  G  G  G  G

```

(その1つは、Phe-Asn-Gln-Phe-Asn をコードする領域がH. ラヌギノーザのリパーゼmRNAと相補的である) をApplied Biosystems, Inc. のDNA合成装置上で合成し、PAGEにより精製する。H. ラヌギノーザcDNAライブラリーからの約10,000のE. コリ組換え体をWhatman 540 フィルターに移す。Gergen他 (Nucleic Acids Res. 7:2115-2135, 1979) により記載されたようにコロニーを溶解させ固定化する。Boel他 (EMBO J. 3: 1097-1102, 1984) により記載され

た通りに該フィルターを<sup>32</sup>P-標識H. ラヌギノーザリパーゼ特異的ペンタデカマー混合物とハイブリダイズさせる。フィルターのハイブリダイゼーションと洗浄をそれぞれ37℃と43℃で行い、次いで映像強化膜を使って24時間オートラジオグラフィーを行う。標準手順 (BirnboimおよびDoly, Nucleic Acids Res. 7:1513-1523, 1979) により2つのハイブリダイズしているコロニーpHLL 702.3 とpHLL 702.4 からMiniprepプラスミドDNAを単離し、そしてMaxam およびGilbert (Methods Enzymol. 65: 499-560, 1980) の手順により該DNA挿入断片のDNA配列を決定する。

該cDNAを使った作製作業を更に容易にするために、次のようにしてユニーク制限部位を含むDNA配列を該cDNAの5'末端と3'末端に付加する。3'非翻訳領域中でcDNAを消化するSau96IでpHLL 702.3を消化し、生じた末端をE. コリDNAポリメラーゼ(クレノウ断片)と4つのdNTPを使ってフィルインする。このDNAを次いで該cDNAのメチオニン開始コドンのすぐ3'側を1回切断するSacIで消化する。得られた0.9kb cDNA断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、電気溶出し、そして連結反応に備える。5'アダプターとして2つのオリゴヌクレオチド927と928を合成する。このアダプターは、cDNAのMet開始コドンのすぐ5'にHindIIIとBamHI部位を付加するようにデザインされる。この2つのオリゴをATPとT<sub>4</sub>ポリヌクレオチドキナーゼを使ってリン酸化し、互いにアニーリングし、そしてHindIIIとHincIIで消化し0.7%アガロースゲル上で精製したpUC19ベクター中の精製0.9kb cDNA配列に連結せしめる。得られたプラス

ミドは、ポータブル0.9 kb BamHI断片としてH. ラヌギノーザのリパーゼcDNAを担持している。BamHI 消化とアガロースゲル上での0.9 kb cDNA 断片の精製の後、その断片をBamHI で消化されリン酸化されたp775と連結せしめ、p960を作製

する。p960中では、リパーゼcDNAがA. オリゼからのTAKAプロモーターとA. ニガーからのAMG ターミネーターの転写調節下に置かれている。

pMHan37 を調製するために、フミコーラ・ラヌギノーザのリパーゼ遺伝子のすぐ上流のA. オリゼTAKAプロモーターの5' 非翻訳領域の60塩基対を、A. ニデュランスのtpiA遺伝子 (McKnight他, Cell 46: 143-147, 1986) からの対応領域により置換することにより、p960を変更する。非翻訳領域のすぐ外側にp960配列と相同である20塩基対により各端において隣接されたA. ニデュランスのtpiA遺伝子からの5' 非翻訳領域を含む合成オリゴヌクレオチドを、TAKAプロモーター領域中にBssHII部位を含む別のプライマーと一緒にPCR反応に使用する。変異誘発プライマーはATG 開始コドンの近くにBamHI 部位を含むので、PCR断片をBamHI とBssHIIで消化し、そしてBssHIIで消化しBamHI で部分消化したp960中に再クローニングする。MHan37中のATG コドンの上流の200 塩基をDNA配列分析により確認する。p960とpMHan37 との配列の相違を下記に示す：

pMHan37	CATGCTTGGAGTTTCCAACCTCAATTTACCTCTATCCACACTTCTCTT
P960	CATGCTTGGAG...GATAGCAACCGACAACATCACATCAAGCTCTCC
pMHan37	CCTTCCTCAACAATAAACCCACAGGGG..GGATCC
p960	CTTCTCTGAATCCTCTATATACACAACCTGGGGATCC

BamHI 部位を包含するプライマーの配列：

5' GCTCCTCATGGTGGATCCCCAGTTGTGTATATAGACCATTGAGGAAGGAAGA  
GAAGTGTGGATAGAGGTAAATTGAGTTGGAACTCCAAGCATGGCATCCCTTGC 3'

5. コブリナス・シネレウス (Coprinus cinereus) ペルオキシダーゼ。コブリナス・シネレウスのペルオキシダーゼ遺伝子の単離および発現はW0 92/16634中に記載されている。簡単に言えば、Boel他 (EMBO J. 3:1097-1102, 1984) とChirgwin他 (BioChemistry



18: 5294-5299, 1979) により記載された通りに最大ペルオキシダーゼ活性の時期に収集しホモジナイズしたコプリナス・シネレウス (IFO 8371) 菌糸から全 RNA を抽出する。AvivおよびLeder (PNAS USA 69: 1408-1412, 1972) により記載されたようなオリゴ (dT) -セルロース上での2度のアフィニティークロマトグラフィーにより、ポリ (A) 含有 RNA を得る。製造業者の取扱説明書に従ってInvitrogenからのcDNA合成キットを使ってcDNAを合成する。コプリナス・シネレウスcDNAライブラリーからの約50,000のE. コリ形質転換体をWhatman 540 濾紙に移す。Gergen他 (Nucleic Acids Res. 7:2115-2135, 1979) により記載されたようにコロニーを溶解させ固定化する。該フィルターを0.2×SSC, 0.1% SDS 中で<sup>32</sup>P-標識430塩基対ペルオキシダーゼ特異的プローブとハイブリダイズさせる。フィルターのハイブリダイゼーションと洗浄を65℃で行い、次いで映像強化膜を使って24時間オートラジオグラフィーを行う。オートラジオグラフィー後、増加する温度でフィルターを洗浄し、次いで映像強化膜を使って24時間オートラジオグラフィーを行う。こうして、50以上の陽性クローンが同定される。ハイブリダイズしているコロニーから標準手順 (BirnboimおよびDoly, Nucleic Acids Res. 7:1513-1523, 1979) によりMiniprepプラスミドDNAを単離し、そしてSangerのジデオキシ法 (Sanger他, PNAS USA 74:5463-5467, 1977) によりcDNA挿入断片のDNA配列を決定する。このペルオキシダーゼcDNA断片をHind III/XhoIでの開裂によりベクターから切り出し、アガロースゲル電気泳動により精製し、電気溶出し、そして連結反応に備える。該cDNA断片をHind III/XhoIで消化されたHD414中に連結せしめ、該cDNAがA. オリゼからのTAKAプロモーターとA. ニガーからのAMGターミネーターの転写調節下に置かれているpCipを作製する。pCipから、ペルオキシダーゼ開始コード

のすぐ上流のSacI, KpnI, HindIII, PstI, SalIおよびBamHI制限部位が削除されているプラスミドpJVi9を調製する。

コプリナス・シネレウスのペルオキシダーゼをコードするcDNA配列は配列表の配列番号5と6に示される。

作製した発現ベクターの要約を表1に与える。

表 1. 新規宿主候補の同時形質転換に使用する発現ベクター

ベクター	コードされる 遺伝子	プロモーター	ターミネーター
pMHan37	<i>H. lanuginosa</i> リパーゼ (HLL)	TAKA-アミラ ーゼ	A M G
pAXX40-1-1	<i>H. insolens</i> キシラナーゼ	TAKA-アミラ ーゼ	A M G
pCaHj418	<i>H. insolens</i> セルラーゼ	TAKA-アミラ ーゼ	A M G
pJVi9	<i>Coprinus cinereus</i> ペルオキシダーゼ (CiP)	TAKA-アミラ ーゼ	A M G
pMT1229	<i>Candida antarctica</i> リパーゼ A	TAKA-アミラ ーゼ	A M G

III. アスペルギルス宿主の形質転換

例外を表記しない限り、試験した全ての株の形質転換において次の一般手順を使用する。

100 mlのMY50培地に形質転換しようとする株の胞子を接種し、34℃で振盪しながら1～2日間インキュベートする。ミラクロス (Miracloth) を通した濾過により菌糸を収集し、200 mlの0.6M MgSO<sub>4</sub>で洗浄する。菌糸を15mlの1.2M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=5.8中に懸濁する。この懸濁液を氷上で冷却し、それに120 mgの

Novozyme® 234を含む緩衝液 1 mlを加える。5分後、1 mlの12mg/ml BSA (Sigma H25 型) を加え、顕微鏡下で観察した時に試料中に多数のプロトプラストが見えるようになるまで穏やかに攪拌しながら37℃で1.5～2.5時間インキュベーションを続ける。

この懸濁液をミラクロスを通して濾過し、濾液を無菌試験管に移し、その上に5 mlの0.6 M ソルビトール, 100 mM Tris-HCl, pH = 7.0 を重層する。2500 rpmで15分間遠心を行い、MgSO<sub>4</sub>クッションの上部からプロトプラストを収集する。2容のSTC (1.2 M ソルビトール, 10 mM Tris-HCl pH = 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) をプロトプラスト懸濁液に加え、混合物を1000×gで5分間遠心する。プロトプラスト・ペレットを37mlのSTC中に再懸濁し、再びペレット化する。これを繰

り返した後、プロトプラストを0.2 ~ 1 mlのSTCに再懸濁する。

100  $\mu$  l のプロトプラスト懸濁液を10  $\mu$  l のSTC中の5 ~ 25  $\mu$  gの適当なDNAと混合する。着目の構造遺伝子を含む発現ベクター（表1参照）と選択マーカを含むプラスミドを使って各株を同時形質転換せしめる。プラスミドpToC90とpToC186はA. ニデュランスamdS遺伝子を含み、形質転換および唯一の窒素源としてのアセトアミド上での増殖についての選択に使われる。プラスミドpJaL77とpJaL154 は形質転換およびヒグロマイシンB耐性の選択に使われる。

混合物を室温で25分間維持する。0.2 mlの60% PEG 4000 (BDH 29576) , 10mM CaCl<sub>2</sub> および10mM Tris-HCl pH = 7.5 を加え、注意深く2度混合し、最後に同じ溶液0.85mlを加え、注意深く混合する。この混合物を室温で25分間維持し、2500  $\times$  g で15分間遠心し、ペレットを2mlの1.2 M ソルビトール中に再懸濁する。もう1回沈澱させた後、プロトプラストを適当な平板上に塗抹する。1.0 M ショ糖 , pH=7.0、窒素源としての10 mM アセトアミド (amdSが選択マーカである時) およびバックグラウンド増殖を阻害するための

20 mM CsClを含有する最少培地 (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113: 51-56, 1966) 上にプロトプラストを塗抹する。hygBが選択マーカである時、培地は窒素源として10 mM 亜硝酸ナトリウムを使いそして150  $\mu$  g/mlのヒグロマイシンBが存在する点で異なる。最終遠心段階、再懸濁および塗抹に代わるものとして、8 mlのSTCを加えてプロトプラストと混合し、3枚の選択用平板の各々に3mlを加え、次いで渦巻状に動かして平板全体に広げる。37℃で4 ~ 7日間インキュベートした後、分生子を有するコロニーを取り、滅菌蒸留水に懸濁し、そして単一コロニーの選択のために塗抹する。この手順を繰り返し、2回目の再単離後の単一コロニーの胞子を限定された形質転換体として保存する。

#### IV. 組換えタンパク質発現の評価

上記手順の後、選択された株の個々の単離物を表1に記載の発現ベクターのうちの1つと前の実施例で言及した選択マーカを含むプラスミドのうちの1つを使って同時形質転換させる。次いで各々の同時形質転換体を適当なアッセイにより試験して着目の遺伝子の発現を調べる。

### A. リパーゼ

リパーゼ活性の同時形質転換体を、1 l の蒸留水中、50 g/l のマルトデキストリン、2 g/l の  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2 g/l の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、3 g/l の  $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、4 g/l のクエン酸、8 g/l の酵母エキスを、3 g/l の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.57 ml の微量金属溶液、4 ml の50 % 尿素溶液（別々に加圧滅菌したもの）、pH 6.0 から成る M400Da 培地中で培養し、そして5 g/l の酵母エキスを水道水中に800 ml 作製する。加圧滅菌後、166 ml の濾過滅菌済の1 M 尿素（10 g/l の最終濃度を与える）と35.3 ml の濾過滅菌済の1 M  $\text{NaNO}_3$ （0.3 % の最終濃度を与える）を加える。

基質として p-ニトロフェニルブチレート (pNB) を使って培養濾液中のリパーゼ活性を測定する。pNB の原液は、104.6  $\mu$  l の pNB を 5 ml の DMSO に加えることにより調製する。マイクロタイタープレートの各ウエルに90  $\mu$  l の 50 mM Tris, pH 7 を加える。各ウエルに10  $\mu$  l の試料を加え、マイクロタイタープレートを約1分間振盪することにより混合する。アッセイの直前に、20  $\mu$  l の pNB 原液を970  $\mu$  l の 50 mM Tris 緩衝液、pH 7 と混合する。市販のプレートリーダーを使ってリパーゼ活性についてアッセイする直前に、100  $\mu$  l の pNB - Tris 混合物を各試料ウエルに加え、3 分間に渡り405 nm で吸光度を測定する。アッセイは温度感受性であるので、各試料セットと共に内部標準を使用する。各試料について決定された傾きはリパーゼ活性と正比例する；アッセイの直線領域は約0.005 ~ 5  $\mu$  g リパーゼ/ml である。この型のアッセイにおいて、H. ラヌギノーザのリパーゼの比活性は約4000 LU/mg であると決定され、一方でカンジダのリパーゼ A の比活性は約400 LU/mg である。

### B. キシラナーゼ

全てのキシラナーゼ形質転換体は次の組成 (g/l で) を有する培地中で増殖させる：マルトデキストリン、50； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.0； $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、10.0； $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、2.0；クエン酸、2.0；酵母エキス、10.0；AMG 微量金属溶液、0.5 ml；尿素2.0；pH 6.0。全ての形質転換体は34℃で深部攪拌培養物として増殖させる。

培養プロセス中のキシラナーゼ活性は、クエン酸塩-リン酸塩緩衝液、pH 6.5 中に懸濁した 0.2 % AZCL-キシラン (Megazyme Co., Australia) を使って測定す

る。培養液を通常は100 倍希釈し、希釈した培養液10  $\mu$  l を1 mlの 0.2% AZCL-キシラン基質と混合する。この混合物を42℃で30分間インキュベートする。反応混合物を5分毎によく混合する。インキュベーションの終わりに、10,000 rpmで

の5分間の遠心により未消化の基質を沈澱させる。基質から放出された青色色素を595 nmでの吸光度により定量し、そして既知の活性を有する酵素調製物を使って作った標準曲線から培養プロセス中の酵素活性の量を計算する。同一条件下で調製した酵素標準物と比較してエンドキシラナーゼ単位(EXU)を決定する。

#### C. セルラーゼ

セルラーゼ形質転換体をMY50培地 (50 g/lのマルトデキストリン, 2 g/l のMgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 g/lのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/l のK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/lのクエン酸, 10 g/lの酵母エキス, 0.5 mlの微量金属溶液, 2.0 g の尿素) 中で深部培養物として34℃で増殖させる。

セルラーゼ活性は、0.1 M クエン酸塩-リン酸塩緩衝液, pH 6.5中に懸濁した 0.2% AZCL-HE-セルロース (Megazyme) を基質として使って測定する。培養液を0.1 M クエン酸塩緩衝液, pH 6.5中に希釈し、希釈した培養液10  $\mu$  l を1 mlの 0.2% AZCL-HE-セルロースと混合する。この混合物を振盪しながら42℃で30分間インキュベートする。反応混合物を5分毎によく混合する。インキュベーション後、10,000 rpmでの5分間の遠心により未消化の基質を沈澱させる。上清中の青色色素を595 nmで分光光度的に定量し、そして既知のセルラーゼ標準物を使って作った標準曲線から酵素活性の量を決定する。同一条件下で調製した酵素標準物と比較してエンドセルラーゼ単位(ECU)を決定する。

#### D. ペルオキシダーゼ

CiP の同時形質転換体は、1 l の蒸留水中、50 g/lのマルトデキストリン, 2 g/l のMgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2 g/l のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g/l のK<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 g/l のクエン酸, 8 g/l の酵母エキス, 3 g/l の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mlの微量金属溶液, 4 mlの50% 尿素溶液 (別々に加圧滅菌したもの), pH 6.0から成るM400Da培地中で培養する。

基質としてABTSを使ってまたは既知濃度の標準物に比較したロケット免疫電気

泳動により、ペルオキシダーゼ発現をモニタリングする。免疫拡散法のために、T M緩衝液 (1.3 g/l のTris塩基, 0.6 g/lのマレイン酸, pH 7) 中の1%アガロースを溶融し次いで55℃に冷却する。400  $\mu$  l のCiP に対するウサギ抗血清を15mlのアガロースと混合し、10cm×10cmの平板上に塗抹しそして凝固させる。C D M中で37℃で7日間増殖させたCiP 形質転換体のC D M寒天 (1 g/l の $K_2P_4$ , 30 g/l のショ糖, 0.3 g/l の $NaNO_3$ , 0.05 g/lのKCl, 0.05 g/l の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.001 g/l の $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.001 g/l の $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.0005 g/lの $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 20 g/lのマルトデキストリン, 15 g/lのアガロース) 培養試料を、寒天平板上に作った5mmの穴に適用する。タンパク質を48時間拡散させる。該平板をクーマシーブルーRで染色してタンパク質-抗体沈澱帯を可視化する。標準溶液として、500, 1000および2000ペルオキシダーゼ単位 (PODU) /mlの濃度で精製物質を使用する。1 PODUは、標準条件下で1分あたり1  $\mu$  モルの過酸化水素の変換を触媒する酵素の量である。

ABTS [ 2, 2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホネート) ] 法によりペルオキシダーゼを測定するために、2mlの2 mM ABTS [0.1 M リン酸塩緩衝液 (10.63 g のリン酸水素二ナトリウム二水和物 p.a. M6580 と5.49 gのリン酸二水素カリウムp.a. M4873を脱イオン水中に溶かして1 lにしたもの) 中の0.110 g のABTS, Boehringer Mannheim No. 102946] を30℃で10分間予熱する。これにガラス試験管中の10.6 mM  $H_2O_2$  溶液 (1.0 g の

Perhydrol Suprapur® 30 %  $H_2O_2$  Merck 7298を脱イオン水に溶かして25mlにしたもの) と0.2 mlの試料または標準物質 (標準物質=5.0 mgのKem-En-Tec, grade 1, No. 4140Aをリン酸塩緩衝液に溶か

して25mlに調整し、それを400倍希釈したもの) を加える。反応を30℃で3分間行う。試料の吸光度をMilli Q 脱イオン水に対して418 nmで測定し、3分間監視する。ペルオキシダーゼ活性の最良の反映は吸光度差:  $\Delta A = A_{(t_2, \dots)} - A_{(t_1, \dots)}$  により与えられる。吸光度差は試料では0.05~0.1 PODU/mlに相当する0.15~0.30の間にあるだろう。

## VI. 結果および考察

表2は、本発明の代用宿主により生産される様々な異種真菌酵素の発現レベルを要約する。全ての株が少なくとも1つの着目の遺伝子の発現に成功したことがこの表から明らかである。幾つかの場合には、新規宿主株が意外にも高レベルの酵素を与える。例えば、A. アクレータス、A. ジャボニカスおよびA. ジャボニカス変種アクレータスの各々の少なくとも1つの株が振盪フラスコ培養において驚くほど高いレベルのHLLを生産し(1lあたり約1g)、それらの種が多量の異種タンパク質を発現できることを証明する。実際、それらの形質転換体により生産されるHLLの生産レベルは、A. オリゼの最良の一次形質転換体と同じ位またはそれより高いと思われる。

A. ジャボニカスもまた、A. オリゼおよびA. ニガー B080 に比べてキシラナーゼの生産のための優れた宿主であることがわかる。この酵素についての振盪フラスコ収率は、最良のA. オリゼ形質転換体に見られるレベルの約2倍である。

A. アクレータス A1455株もカンジダ・アンタークティカのリパーゼAの良好な生産を示し、同じ条件下で培養した対応するA. オリゼ一次形質転換体よりも約3~4倍優れている、g/l範囲の振盪フラスコ収率を与える。

表2. A. ジャポニカス型種における真菌酵素の発現

種/株	選択	発現される 遺伝子	形質転換体数 (陽性の数)	発現収率 (振盪フラスコ)
A. aculeatus N1136	amdS	CiP	33 (2)	0.06 g/l
	amdS	HLL	25 (2)	—
	amdS	キシラーゼ	28 (9)	0.02-0.05g/l
	amdS	リパーゼ A	41 (5)	—
A. acleatus A1454	amdS	セルラーゼ	21 (7)	0.3 g/l
A. acleatus A1455	amdS	HLL	28 (21)	1.0 g/l
	amdS	リパーゼ A	15 (14)	1.0 g/l
A. japonicus A1438	amdS	CiP	11 (6)	0.05-0.1 g/l
	amdS	HLL	38 (15)	1.0-1.5 g/l
	amdS	キシラーゼ	31 (13)	0.08 g/l
	hygB	リパーゼ	22 (14)	0.18 g/l
	amdS	セルラーゼ	42 (28)	0.5 g/l
A. japonicus var. aculeatus N0956	amdS	HLL	19 (13)	1.0 g/l
	amdS	セルラーゼ	26 (7)	0.2-0.3 g/l
A. oryzae A1560 対照 (スクリーニングした20以 上のうち、最良の一 次形質転換体)	amdS	CiP	対照	0.25 g/l
	amdS	HLL	対照	1 g/l
	amdS	セルラーゼ	対照	0.75-1 g/l
	amdS	キシラーゼ	対照	0.1 g/l
	amdS	リパーゼ A	対照	0.3 g/l

与えられたデータからわかるように、A. ジャポニカス型種の多数の株が様々な異種タンパク質を相当量生産することができ、従って標準的なA. ニガーおよびA. オリゼ宿主系の代替物として有用であると確立され、またそれらの既知宿主の使用よりも好ましい場合がある。



生物学的材料の寄託

下記の生物学的材料をNRRL (Agricultural Research Service Culture Collection; 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604) に寄託した。

<u>細胞系</u>	<u>寄託番号</u>
pJVi9 を含有する E. コリ DH5 $\alpha$	NRRL B-21161
pCaHJ418を含有する E. コリ DH5 $\alpha$	NRRL B-21162
pMT1229 を含有する E. コリ DH5 $\alpha$	NRRL B-21163
pAXX40-1-1を含有する E. コリ DH5 $\alpha$	NRRL B-21164
pMHan37 を含有する E. コリ DH5 $\alpha$	NRRL B-21165

## 配 列 表

## (I) 一般情報 :

(i) (A) 名称 : ノボ ノルディスク バイオテック, インコーポレイテッド

(B) 通り : デュリュアベニュー 1445

(C) 市 : カリフォルニア州デービス

(D) 国 : アメリカ合衆国

(E) 郵便番号 (Z I P) : 95616-4880

(F) 電話 : (916) 757-8100

(G) テレファックス : (916) 757-0317

(ii) 発明の名称 : アスベルギルス発現系

(iii) 配列の数 : 6

(iv) 連絡先 :

(A) あて先 : ノボ ノルディスク オブ ノースアメリカ, インコーポレイテッド

(B) 通り : 405 レキシントン アベニュー, スート 6400

(C) 市 : ニューヨーク市

(D) 州 : ニューヨーク州

(E) 国 : U S A

(F) Z I P : 10174-6201

(v) コンピューター読み取り形式 :

(A) 媒体型 : フロッピーディスク

(B) コンピューター : IBM PC互換型

(C) 駆動システム : PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフト : PatentIn Release #1.0. Version #1.25

- (vi) 本願データ :
  - (A) 出願番号 : US
  - (B) 出願日 : 1994年11月29日
  - (C) 分類 :
- (viii) 代理人情報 :
  - (A) 名称 : Lowney Dr., Karen A.
  - (B) 登録番号 : 31,274
  - (C) 参照/整理番号 : 4086,204-W0
- (xi) 電気通信情報 :
  - (A) 電話 : 212-867-0123
  - (B) テレファックス : 212-867-0298
- (2) 配列番号 1 :
  - (i) 配列の特徴 :
    - (A) 配列の長さ : 1389塩基対
    - (B) 配列の型 : 核酸
    - (C) 鎖の数 : 一本鎖
    - (D) トポロジー : 直鎖状
  - (ii) 配列の種類 : genomic DNA
  - (iii) ハイボセティカル : No
  - (iv) アンチセンス : No
  - (vi) 起源 :
    - (A) 生物名 : カンジダ・アンタークティカ  
(Candida antarctica)
    - (C) 単離個体名 : DSM 3855
  - (ix) 特徴 :
    - (A) 特徴を表す記号 : CDS
    - (B) 存在位置 : 1..1389

## (xi) 配列の記載 : 配列番号 1

ATG CGA GTG TCC TTG CGC TCC ATC ACG TCG CTG CTT GCG GCG GCA ACG Met Arg Val Ser Leu Arg Ser Ile Thr Ser Leu Leu Ala Ala Ala Thr 1 5 10 15	48
GCG GCT GTG CTC GCG GCT CCG GCG GCC GAG ACG CTG GAC CGA CGG GCG Ala Ala Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Thr Leu Asp Arg Arg Ala 20 25 30	96
GCG CTG CCC AAC CCC TAC GAC GAT CCC TTC TAC ACG ACG CCA TCC AAC Ala Leu Pro Asn Pro Tyr Asp Asp Pro Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Asn 35 40 45	144
ATC GGC ACG TTT GCC AAG GGC CAG GTG ATC CAA TCT CCG AAG GTG CCC Ile Gly Thr Phe Ala Lys Gly Gln Val Ile Gln Ser Arg Lys Val Pro 50 55 60	192
ACG GAC ATC GGC AAC GCC AAC AAC GCT GCG TCG TTC CAG CTG CAG TAC Thr Asp Ile Gly Asn Ala Asn Asn Ala Ala Ser Phe Gln Leu Gln Tyr 65 70 75 80	240
CGC ACC ACC AAT ACG CAG AAC GAG GCG GTG GCC GAC GTG GCC ACC GTG Arg Thr Thr Asn Thr Gln Asn Glu Ala Val Ala Asp Val Ala Thr Val 85 90 95	288
TGG ATC CCG GCC AAG CCC GCT TCG CCG CCC AAG ATC TTT TCG TAC CAG Trp Ile Pro Ala Lys Pro Ala Ser Pro Pro Lys Ile Phe Ser Tyr Gln 100 105 110	336
GTC TAC GAG GAT GCC ACG GCG CTC GAC TGT GCT CCG AGC TAC AGC TAC Val Tyr Glu Asp Ala Thr Ala Leu Asp Cys Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr 115 120 125	384
CTC ACT GGA TTG GAC CAG CCG AAC AAG GTG ACG GCG GTG CTC GAC ACG Leu Thr Gly Leu Asp Gln Pro Asn Lys Val Thr Ala Val Leu Asp Thr 130 135 140	432
CCC ATC ATC ATC GGC TGG GCG CTG CAG CAG GGC TAC TAC GTC GTC TCG Pro Ile Ile Ile Gly Trp Ala Leu Gln Gln Gly Tyr Tyr Val Val Ser 145 150 155 160	480
TCC GAC CAC GAA GGC TTC AAA GCC GCC TTC ATC GCT GGC TAC GAA GAG Ser Asp His Glu Gly Phe Lys Ala Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Glu Glu 165 170 175	528
GGC ATG GCT ATC CTC GAC GGC ATC CGC GCG CTC AAG AAC TAC CAG AAC Gly Met Ala Ile Leu Asp Gly Ile Arg Ala Leu Lys Asn Tyr Gln Asn 180 185 190	576
CTG CCA TCC GAC AGC AAG GTC GCT CTT GAG GGC TAC AGT GGC GGA GCT Leu Pro Ser Asp Ser Lys Val Ala Leu Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Ala 195 200 205	624
CAC GCC ACC GTG TGG GCG ACT TCG CTT GCT GAA TCG TAC GCG CCC GAG His Ala Thr Val Trp Ala Thr Ser Leu Ala Glu Ser Tyr Ala Pro Glu 210 215 220	672
CTC AAC ATT GTC GGT GCT TCG CAC GGC GGC ACC CCC GTG AGC GCC AAG Leu Asn Ile Val Gly Ala Ser His Gly Gly Thr Pro Val Ser Ala Lys 225 230 235 240	720
GAC ACC TTT ACA TTC CTC AAC GGC GGA CCC TTC GCC GGC TTT GCC CTG Asp Thr Phe Thr Phe Leu Asn Gly Gly Pro Phe Ala Gly Phe Ala Leu 245 250 255	768

GCG GGT GTT TCG GGT CTC TCG CTC GCT CAT CCT GAT ATG GAG AGC TTC Ala Gly Val Ser Gly Leu Ser Leu Ala His Pro Asp Met Glu Ser Phe 260 265 270	816
ATT GAG GCC CGA TTG AAC GCC AAG GGT CAG CGG ACG CTC AAG CAG ATC Ile Glu Ala Arg Leu Asn Ala Lys Gly Gln Arg Thr Leu Lys Gln Ile 275 280 285	864
CGC GGC CGT GGC TTC TGC CTG CCG CAG GTG GTG TTG ACC TAC CCC TTC Arg Gly Arg Gly Phe Cys Leu Pro Gln Val Val Leu Thr Tyr Pro Phe 290 295 300	912
CTC AAC GTC TTC TCG CTG GTC AAC GAC ACG AAC CTG CTG AAT GAG GCG Leu Asn Val Phe Ser Leu Val Asn Asp Thr Asn Leu Leu Asn Glu Ala 305 310 315 320	960
CCG ATC GCT AGC ATC CTC AAG CAG GAG ACT GTG GTC CAG GCC GAA GCG Pro Ile Ala Ser Ile Leu Lys Gln Glu Thr Val Val Gln Ala Glu Ala 325 330 335	1008
AGC TAC ACG GTA TCG GTG CCC AAG TTC CCG CGC TTC ATC TGG CAT GCG Ser Tyr Thr Val Ser Val Pro Lys Phe Pro Arg Phe Ile Trp His Ala 340 345 350	1056
ATC CCC GAC GAG ATC GTG CCG TAC CAG CCT GCG GCT ACC TAC GTC AAG Ile Pro Asp Glu Ile Val Pro Tyr Gln Pro Ala Ala Thr Tyr Val Lys 355 360 365	1104
GAG CAA TGT GCC AAG GGC GCC AAC ATC AAT TTT TCG CCC TAC CCG ATC Glu Gln Cys Ala Lys Gly Ala Asn Ile Asn Phe Ser Pro Tyr Pro Ile 370 375 380	1152
GCC GAG CAC CTC ACC GCC GAG ATC TTT GGT CTG GTG CCT AGC CTG TGG Ala Glu His Leu Thr Ala Glu Ile Phe Gly Leu Val Pro Ser Leu Trp 385 390 395 400	1200
TTT ATC AAG CAA GCC TTC GAC GGC ACC ACA CCC AAG GTG ATC TGC GGC Phe Ile Lys Gln Ala Phe Asp Gly Thr Thr Pro Lys Val Ile Cys Gly 405 410 415	1248
ACT CCC ATC CCT GCT ATC GCT GGC ATC ACC ACG CCC TCG GCG GAC CAA Thr Pro Ile Pro Ala Ile Ala Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ala Asp Gln 420 425 430	1296
GTG CTG GGT TCG GAC CTG GCC AAC CAG CTG CGC AGC CTC GAC GGC AAG Val Leu Gly Ser Asp Leu Ala Asn Gln Leu Arg Ser Leu Asp Gly Lys 435 440 445	1344
CAG AGT GCG TTC GGC AAG CCC TTT GGC CCC ATC ACA CCA CCT TAG Gln Ser Ala Phe Gly Lys Pro Phe Gly Pro Ile Thr Pro Pro 450 455 460	1389

## (2) 配列番号 2 :

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 462 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列の記載 : 配列番号 2

```

Met Arg Val Ser Leu Arg Ser Ile Thr Ser Leu Leu Ala Ala Ala Thr
 1           5           10           15

Ala Ala Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Thr Leu Asp Arg Arg Ala
      20           25           30

Ala Leu Pro Asn Pro Tyr Asp Asp Pro Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Asn
      35           40           45

Ile Gly Thr Phe Ala Lys Gly Gln Val Ile Gln Ser Arg Lys Val Pro
 50           55           60

Thr Asp Ile Gly Asn Ala Asn Asn Ala Ala Ser Phe Gln Leu Gln Tyr
 65           70           75           80

Arg Thr Thr Asn Thr Gln Asn Glu Ala Val Ala Asp Val Ala Thr Val
      85           90           95

Trp Ile Pro Ala Lys Pro Ala Ser Pro Pro Lys Ile Phe Ser Tyr Gln
      100           105           110

Val Tyr Glu Asp Ala Thr Ala Leu Asp Cys Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr
      115           120           125

Leu Thr Gly Leu Asp Gln Pro Asn Lys Val Thr Ala Val Leu Asp Thr
 130           135           140

Pro Ile Ile Ile Gly Trp Ala Leu Gln Gln Gly Tyr Tyr Val Val Ser
 145           150           155           160

Ser Asp His Glu Gly Phe Lys Ala Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Glu Glu
      165           170           175

Gly Met Ala Ile Leu Asp Gly Ile Arg Ala Leu Lys Asn Tyr Gln Asn
      180           185           190

Leu Pro Ser Asp Ser Lys Val Ala Leu Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Ala
      195           200           205

His Ala Thr Val Trp Ala Thr Ser Leu Ala Glu Ser Tyr Ala Pro Glu
      210           215           220

Leu Asn Ile Val Gly Ala Ser His Gly Gly Thr Pro Val Ser Ala Lys
 225           230           235           240

Asp Thr Phe Thr Phe Leu Asn Gly Gly Pro Phe Ala Gly Phe Ala Leu
      245           250           255

Ala Gly Val Ser Gly Leu Ser Leu Ala His Pro Asp Met Glu Ser Phe
      260           265           270

Ile Glu Ala Arg Leu Asn Ala Lys Gly Gln Arg Thr Leu Lys Gln Ile
      275           280           285

Arg Gly Arg Gly Phe Cys Leu Pro Gln Val Val Leu Thr Tyr Pro Phe
      290           295           300

Leu Asn Val Phe Ser Leu Val Asn Asp Thr Asn Leu Leu Asn Glu Ala
 305           310           315           320

```

(ix) 特徵：

( A ) 特徴を表す記号 : CDS

( B ) 存在位置 : 126..806

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 3

AATACGACTC ACTATAGGGA ATATTAAGCT TCGTACCGAG CTCGGATCCA CTAGTAACGG	60
CCGCCAGTGT GCTCTAAAGC GCCGCTTCTT CAGTTGTGTA CGATCATCCA GCAACTCGCA	120
GCACC ATG GTC TCG CTC AAG TCT GTC CTC GCG GCC GCC ACG GCT GTG Met Val Ser Leu Lys Ser Val Leu Ala Ala Ala Thr Ala Val	167
1 5 10	
AGC TCT GCC ATT GCT GCC CCT TTT GAC TTC GTT CCT CGG GAC AAC TCG Ser Ser Ala Ile Ala Ala Pro Phe Asp Phe Val Pro Arg Asp Asn Ser	215
15 20 25 30	
ACG GCC CTT CAG GCT CGA CAG GTG ACC CCC AAC GGC GAG GGC TGG CAC Thr Ala Leu Gln Ala Arg Gln Val Thr Pro Asn Gly Glu Gly Trp His	263
35 40 45	
AAC GGC TAC TTC TAC TCG TGG TGG TCC GAC GGC GGA GGC CAG GTT CAG Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Trp Trp Ser Asp Gly Gly Gly Gln Val Gln	311
50 55 60	
TAC ACC AAC CTC GAG GGC AGC CGC TAC CAG GTC AGA TGG CGT AAC ACC Tyr Thr Asn Leu Glu Gly Ser Arg Tyr Gln Val Arg Trp Arg Asn Thr	359
65 70 75	
GGC AAC TTC GTC GGT GGT AAG GGT TGG AAC CCG GGA ACC GGC CGC ACG Gly Asn Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Thr Gly Arg Thr	407
80 85 90	
ATC AAC TAC GGC GGC TAC TTC AAC CCC CAG GGC AAC GGC TAC CTG GCC Ile Asn Tyr Gly Gly Tyr Phe Asn Pro Gln Gly Asn Gly Tyr Leu Ala	455
95 100 105 110	
GTC TAC GGC TGG ACC CGC AAC CCG CTC GTC GAG TAC TAT GTC ATC GAG Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Val Ile Glu	503
115 120 125	
TCG TAC GGC ACG TAC AAT CCC GGC AGC CAG GCT CAG TAC AAG GGC ACA Ser Tyr Gly Thr Tyr Asn Pro Gly Ser Gln Ala Gln Tyr Lys Gly Thr	551
130 135 140	
TTC TAT ACC GAC GGC GAT CAG TAT GAC ATC TTT GTG AGC ACC CGC TAC Phe Tyr Thr Asp Gly Asp Gln Tyr Asp Ile Phe Val Ser Thr Arg Tyr	599
145 150 155	
AAC CAG CCC AGC ATC GAC GGC ACC CCG ACG TTC CAG CAG TAC TGG TCT Asn Gln Pro Ser Ile Asp Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser	647
160 165 170	
ATC CGC AAG AAC AAG CGT GTC GGA GGC TCG GTC AAC ATG CAG AAC CAC Ile Arg Lys Asn Lys Arg Val Gly Gly Ser Val Asn Met Gln Asn His	695
175 180 185 190	
TTC AAC GCG TGG CAG CAG CAC GGA ATG CCG CTC GGC CAG CAC TAC TAC Phe Asn Ala Trp Gln Gln His Gly Met Pro Leu Gly Gln His Tyr Tyr	743
195 200 205	



CAG GTC GTC GCC ACC GAG GGC TAC CAG AGC AGT GGC GAG TCC GAC ATC Gln Val Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Glu Ser Asp Ile 210 215 220	791
TAT GTT CAG ACA CAC TAAGCGACGC ACCCGCATG ACAAAGTCC GTTAGTTACA Tyr Val Gln Thr His 225	846
TGCCGGGTGA AAAGGAGCTA TGCTATGGGC GCGGCAAGAC AGTCACTGCC ATCATGTCAG	906
TCGGAAAAAC ATCGCAGAAT GGTGTTCTTC CGCATGGGAA TTGCCTGAGA CATCTCTCTG	966
GCCATGCATT TTCTTGTTCA TACTTGTTGG GCAGTCGCTT GGTTCCTAC CTCTGTTTAT	1026
AGTCATTCTT TTTCTGTACA TACTTCTTCC TCAACTTTAG AGCACACTGG CGGCCGCTCG	1086
AGCATGCATC TAGAGGGCCG CATCATGTAA TTAGTTA	1123

## (2) 配列番号 4 :

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 227 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列の記載 : 配列番号 4

Met Val Ser Leu Lys Ser Val Leu Ala Ala Ala Thr Ala Val Ser Ser 1 5 10 15	
Ala Ile Ala Ala Pro Phe Asp Phe Val Pro Arg Asp Asn Ser Thr Ala 20 25 30	
Leu Gln Ala Arg Gln Val Thr Pro Asn Gly Glu Gly Trp His Asn Gly 35 40 45	
Tyr Phe Tyr Ser Trp Trp Ser Asp Gly Gly Gly Gln Val Gln Tyr Thr 50 55 60	
Asn Leu Glu Gly Ser Arg Tyr Gln Val Arg Trp Arg Asn Thr Gly Asn 65 70 75 80	
Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Thr Gly Arg Thr Ile Asn 85 90 95	
Tyr Gly Gly Tyr Phe Asn Pro Gln Gly Asn Gly Tyr Leu Ala Val Tyr 100 105 110	
Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Val Ile Glu Ser Tyr 115 120 125	

Gly Thr Tyr Asn Pro Gly Ser Gln Ala Gln Tyr Lys Gly Thr Phe Tyr  
 130 135 140  
 Thr Asp Gly Asp Gln Tyr Asp Ile Phe Val Ser Thr Arg Tyr Asn Gln  
 145 150 155 160  
 Pro Ser Ile Asp Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Ile Arg  
 165 170 175  
 Lys Asn Lys Arg Val Gly Gly Ser Val Asn Met Gln Asn His Phe Asn  
 180 185 190  
 Ala Trp Gln Gln His Gly Met Pro Leu Gly Gln His Tyr Tyr Gln Val  
 195 200 205  
 Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Glu Ser Asp Ile Tyr Val  
 210 215 220  
 Gln Thr His  
 225

## (2) 配列番号 5 :

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 1307塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : cDNA

(iii) ハイボセティカル : No

(iv) アンチセンス : No

(vi) 起源 :

(A) 生物名 : コプリナス・シネレウス

(Coprinus cinereus)

(ix) 特徴 :

(A) 特徴を表す記号 : CDS

(B) 存在位置 : 5..1096

(xi) 配列の記載 : 配列番号 5

TACT ATG AAG CTC TCG CTT TTG TCC ACC TTC GCT GCT GTC ATC ATC GGT  
 Met Lys Leu Ser Leu Leu Ser Thr Phe Ala Ala Val Ile Ile Gly  
 1 5 10 15

GCC CTC GCT CTA CCC CAG GGT CCT GGA GGA GGC GGG TCA GTC ACT TGC	97
Ala Leu Ala Leu Pro Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser Val Thr Cys	
20 25 30	
CCC GGT GGA CAG TCC ACT TCG AAC AGC CAG TGC TGC GTC TCG TTC GAC	145
Pro Gly Gly Gln Ser Thr Ser Asn Ser Gln Cys Cys Val Trp Phe Asp	
35 40 45	
GTT CTA GAC GAT CTT CAG ACC AAC TTC TAC CAA GGG TCC AAG TGT GAG	193
Val Leu Asp Asp Leu Gln Thr Asn Phe Tyr Gln Gly Ser Lys Cys Glu	
50 55 60	
AGC CCT GTT CGC AAG ATT CTT AGA ATT GTT TTC CAT GAC GCG ATC GGA	241
Ser Pro Val Arg Lys Ile Leu Arg Ile Val Phe His Asp Ala Ile Gly	
65 70 75	
TTT TCG CCG GCG TTG ACT GCT GCT GGT CAA TTC GGT GGT GGA GGA GCT	289
Phe Ser Pro Ala Leu Thr Ala Ala Gly Gln Phe Gly Gly Gly Gly Ala	
80 85 90 95	
GAT GGC TCC ATC ATT GCG CAT TCG AAC ATC GAA TTG GCC TTC CCG GCT	337
Asp Gly Ser Ile Ile Ala His Ser Asn Ile Glu Leu Ala Phe Pro Ala	
100 105 110	
AAT GGC GGC CTC ACC GAC ACC GTC GAA GCC CTC CGC GCG GTC GGT ATC	385
Asn Gly Gly Leu Thr Asp Thr Val Glu Ala Leu Arg Ala Val Gly Ile	
115 120 125	
AAC CAC GGT GTC TCT TTC GGC GAT CTC ATC CAA TTC GCC ACT GCC GTC	433
Asn His Gly Val Ser Phe Gly Asp Leu Ile Gln Phe Ala Thr Ala Val	
130 135 140	
GGC ATG TCC AAC TGC CCT GGC TCT CCC CGA CTT GAG TTC TTG ACG GGC	481
Gly Met Ser Asn Cys Pro Gly Ser Pro Arg Leu Glu Phe Leu Thr Gly	
145 150 155	
AGG AGC AAC AGT TCC CAA CCC TCC CCT CCT TCG TTG ATC CCC GGT CCC	529
Arg Ser Asn Ser Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Leu Ile Pro Gly Pro	
160 165 170 175	
GGA AAC ACT GTC ACT GCT ATC TTG GAT CGT ATG GGC GAT GCA GGC TTC	577
Gly Asn Thr Val Thr Ala Ile Leu Asp Arg Met Gly Asp Ala Gly Phe	
180 185 190	
AGC CCT GAT GAA GTA GTT GAC TTG CTT GCT GCG CAT AGT TTG GCT TCT	625
Ser Pro Asp Glu Val Val Asp Leu Leu Ala Ala His Ser Leu Ala Ser	
195 200 205	
CAG GAG GGT TTG AAC TCG GCC ATC TTC AGG TCT CCT TTG GAC TCG ACC	673
Gln Glu Gly Leu Asn Ser Ala Ile Phe Arg Ser Pro Leu Asp Ser Thr	
210 215 220	
CCT CAA GTT TTC GAT ACC CAG TTC TAC ATT GAG ACC TTG CTC AAG GGT	721
Pro Gln Val Phe Asp Thr Gln Phe Tyr Ile Glu Thr Leu Leu Lys Gly	
225 230 235	
ACC ACT CAG CCT GGC CCT TCT CTC GGC TTT GCA GAG GAG CTC TCC CCC	769
Thr Thr Gln Pro Gly Pro Ser Leu Gly Phe Ala Glu Glu Leu Ser Pro	
240 245 250 255	

TTC CCT GGC GAA TTC CGC ATG AGG TCC GAT GCT CTC TTG GCT CGC GAC	817
Phe Pro Gly Glu Phe Arg Met Arg Ser Asp Ala Leu Leu Ala Arg Asp	
260 265 270	
TCC CGA ACC GCC TGC CGA TGG CAA TCC ATG ACC AGC AGC AAT GAA GTT	865
Ser Arg Thr Ala Cys Arg Trp Gln Ser Met Thr Ser Ser Asn Glu Val	
275 280 285	
ATG GGC CAG CGA TAC NNN NNN NNC ATG GCC AAG ATG TCT GTT CTC GGC	913
Met Gly Gln Arg Tyr Xaa Xaa Xaa Met Ala Lys Met Ser Val Leu Gly	
290 295 300	
TTC GAC AGG AAC GCC CTC ACC GAT TGC TCT GAC GTT ATT CCT TCT GCT	961
Phe Asp Arg Asn Ala Leu Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Ser Ala	
305 310 315	
GTG TCC AAC AAC GCT GCT CCT GTT ATC CCT GGT GGC CTT ACT GTC GAT	1009
Val Ser Asn Asn Ala Ala Pro Val Ile Pro Gly Gly Leu Thr Val Asp	
320 325 330 335	
GAT ATC GAG GTT TCG TGC CCG AGC GAG CCT TTC CCT GAA ATT GCT ACC	1057
Asp Ile Glu Val Ser Cys Pro Ser Glu Pro Phe Pro Glu Ile Ala Thr	
340 345 350	
GCC TCA GGC CCT CTC CCC TCC CTC GCT CCT GCT CCT TGATCTCCTC	1103
Ala Ser Gly Pro Leu Pro Ser Leu Ala Pro Ala Pro	
355 360	
AAGATGGTAC ATCCTGCTCT CTCATCATCC CTCTTAGCTA TTTATCCAAT CTATCTACCT	1163
ATCTATGCAG TTTCTGTTCT ATCACCACAG GAAGCAAGAA AGAAAAACAA CAATGCAACG	1223
TGAGCAGAAA TCAGCAAAAA AATAAATCAG TATACTACAG TAATGAGGCC AGTTTGCGTG	1283
GTGTCAAG TAAGTACGAC TCGG	1307

## (2) 配列番号 6 :

## (i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 363 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

(xi) 配列の記載 : 配列番号 6

Met Lys Leu Ser Leu Leu Ser Thr Phe Ala Ala Val Ile Ile Gly Ala  
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Gln Gly Pro Gly Gly Gly Ser Val Thr Cys Pro  
 20 25 30

Gly Gly Gln Ser Thr Ser Asn Ser Gln Cys Cys Val Trp Phe Asp Val  
 35 40 45

Leu Asp Asp Leu Gln Thr Asn Phe Tyr Gln Gly Ser Lys Cys Glu Ser  
 50 55 60  
 Pro Val Arg Lys Ile Leu Arg Ile Val Phe His Asp Ala Ile Gly Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Ala Leu Thr Ala Ala Gly Gln Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp  
 85 90 95  
  
 Gly Ser Ile Ile Ala His Ser Asn Ile Glu Leu Ala Phe Pro Ala Asn  
 100 105 110  
 Gly Gly Leu Thr Asp Thr Val Glu Ala Leu Arg Ala Val Gly Ile Asn  
 115 120 125  
 His Gly Val Ser Phe Gly Asp Leu Ile Gln Phe Ala Thr Ala Val Gly  
 130 135 140  
 Met Ser Asn Cys Pro Gly Ser Pro Arg Leu Glu Phe Leu Thr Gly Arg  
 145 150 155 160  
 Ser Asn Ser Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Leu Ile Pro Gly Pro Gly  
 165 170 175  
 Asn Thr Val Thr Ala Ile Leu Asp Arg Met Gly Asp Ala Gly Phe Ser  
 180 185 190  
 Pro Asp Glu Val Val Asp Leu Leu Ala Ala His Ser Leu Ala Ser Gln  
 195 200 205  
 Glu Gly Leu Asn Ser Ala Ile Phe Arg Ser Pro Leu Asp Ser Thr Pro  
 210 215 220  
 Gln Val Phe Asp Thr Gln Phe Tyr Ile Glu Thr Leu Leu Lys Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Thr Gln Pro Gly Pro Ser Leu Gly Phe Ala Glu Glu Leu Ser Pro Phe  
 245 250 255  
 Pro Gly Glu Phe Arg Met Arg Ser Asp Ala Leu Leu Ala Arg Asp Ser  
 260 265 270  
 Arg Thr Ala Cys Arg Trp Gln Ser Met Thr Ser Ser Asn Glu Val Met  
 275 280 285  
 Gly Gln Arg Tyr Xaa Xaa Xaa Met Ala Lys Met Ser Val Leu Gly Phe  
 290 295 300  
 Asp Arg Asn Ala Leu Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Ser Ala Val  
 305 310 315 320  
 Ser Asn Asn Ala Ala Pro Val Ile Pro Gly Gly Leu Thr Val Asp Asp  
 325 330 335  
 Ile Glu Val Ser Cys Pro Ser Glu Pro Phe Pro Glu Ile Ala Thr Ala  
 340 345 350  
 Ser Gly Pro Leu Pro Ser Leu Ala Pro Ala Pro  
 355 360

## 【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: al Application No PCT/US 94/13613
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/80 C12N9/00 C12N9/30 C12N1/15		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 565 172 (QUEST INTERNATIONAL B.V.) 13 October 1993 see page 18, line 39 - line 43 ---	1-28
A	EP,A,0 305 216 (NOVO INDUSTRI A/S) 1 March 1989 see the whole document -----	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  12 April 1995		Date of mailing of the international search report  29.05.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Cupido, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 94/13613

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FP-A-0565172	13-10-93	AU-B- 3678593 JP-A- 6046861	14-10-93 22-02-94
EP-A-0305216	01-03-89	JP-A- 1157383 JP-C- 1761424 JP-B- 4038394	20-06-89 20-05-93 24-06-92

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, UZ, VN

(72)発明者 タカギ, シノブ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616,  
ディビス, #128, コウエル プールバー  
ド 1880

(72)発明者 プーミナザン, カラッパン チェッティア  
ー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95616,  
ディビス, ハンボルト アベニュー 2233